

Aus der Universitäts-Hautklinik Frankfurt am Main

Direktor: Prof. Dr. med. Herrmann

QUANTITATIVE BESTIMMUNGEN
VON PHOSPHATVERBINDUNGEN IN
HAUT UND LEBER DER RATTE

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen medizinischen Fakultät der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von
Sigrid Rauen
Wiesbaden

Frankfurt/Main 1965

Aus der Universitäts-Hautklinik Frankfurt am Main

Direktor: Prof. Dr. med. Herrmann

QUANTITATIVE BESTIMMUNGEN
VON PHOSPHATVERBINDUNGEN IN
HAUT UND LEBER DER RATTE

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen medizinischen Fakultät der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von
Sigrid Rauen
Wiesbaden
Frankfurt/Main 1965

Dekan : Prof. Dr. W. Rotter

Referent : Prof. Dr. G. Leonhardi

Korreferent : Prof. Dr. A. Wacker

I n h a l t

Vorwort

I. Einleitung

1. Die verschiedenen Phosphatverbindungen,
ihre Bedeutung im intermediären Stoffwechsel
und ihre Lokalisation in der Zelle.
2. Der Phosphatgehalt und seine Verteilung nach
Angaben der Literatur.
 - a) In der Haut
 - b) In der Leber

II. Eigene Untersuchungen

1. Phosphatgehalt der Rattenhaut
2. Phosphatgehalt der Rattenleber
3. Gegenüberstellung der Werte für Haut und Leber
4. Chromatographische Auftrennung des säurelös-
lichen Phosphats in Haut und Leber
5. Enzymatische Bestimmung der einzelnen Phos-
phatverbindungen des säurelöslichen Phosphats

III. Experimenteller Teil

1. Bestimmung des Wassergehalts
2. Aufarbeitung des Gewebes
3. Kolorimetrische Bestimmung des Phosphats

4. Chromatographische Auftrennung des säurelöslichen Phosphats
5. Enzymatische Bestimmung der Verbindungen des säurelöslichen Phosphats

IV. Zusammenfassung

V. Literaturverzeichnis



Vorwort

Um die Stoffwechselverhältnisse in einem erkrankten Gewebe beurteilen zu können, müssen qualitative und quantitative Normalwerte des gesunden Organs bekannt sein. In dieser Arbeit wurde eine Bestimmung des Gehalts der Rattenhaut an Phosphatverbindungen durchgeführt. Da in der Literatur sehr wenig Angaben über derartige Untersuchungen vorliegen, haben wir zum Vergleich und zur Kontrolle Lebergewebe herangezogen, dessen Gehalt an Phosphatverbindungen besser bekannt ist. Die Literaturzitate wurden zusammengestellt und sowohl untereinander als auch mit den eigenen Untersuchungsergebnissen verglichen.

I. Einleitung

1. Die verschiedenen Phosphatverbindungen, ihre Bedeutung im intermediären Stoffwechsel und ihre Lokalisation in der Zelle

In allen Geweben finden sich Phosphatverbindungen in großer Zahl. Zum Teil stellen sie Bausteine wichtiger Zellelemente dar, zum Teil sind sie entscheidend an vielen Reaktionen des intermediären Stoffwechsels beteiligt. Besondere Bedeutung kommt den energiereichen Phosphaten zu, die für die Energiegewinnung bei der Endoxydation der Substrate verantwortlich sind. Es handelt sich dabei vorwiegend um Verbindungen, in denen das Phosphat als Anhydrid, als Acyl- oder Carbamylphosphat vorliegt. Phosphatester sind Energieüberträger von geringerer Bedeutung, bei ihrer Spaltung ist die Energieausbeute relativ klein. Nach dem chemischen Verhalten kann man drei Gruppen von Phosphatverbindungen unterscheiden:

a) Säurelösliches Phosphat

Dazu gehören:

Anorganisches Phosphat

Phosphatester:

Hexosephosphate

Pentosephosphate

Triosephosphate

Cholinphosphate

Nucleotide

Energiereiche Phosphate:

Adenosintriphosphat

Guanosintriphosphat

Uridintriphosphat

Carbamylphosphat

Acylphosphat

Kreatinphosphat

b) Säureunlösliches Phosphat

Dazu gehören:

Ribonucleinsäure

Desoxyribonucleinsäure

Phosphoproteide

c) Lipoidphosphate

Dazu gehören:

Lecithin

Kephalin

Acetalphosphatide

Sphingomyeline

Es wurden folgende Abkürzungen verwandt:

Ribonucleinsäure = RNS, Desoxyribonucleinsäure = DNS,
Adenosintriphosphat = ATP, Adenosindiphosphat = ADP,
Adenosinmonophosphat = AMP, Glucose-1-Phosphat = G-1-P,
Glucose-6-Phosphat = G-6-P, Fructose-6-Phosphat = F-6-P,
Fructose-1,6-Diphosphat = FDP, Phosphoglycerinsäure = PGS

Diese Phosphatfraktionen verteilen sich unterschiedlich auf die Zellelemente. Ihre Lokalisation läßt sich durch Untersuchung der einzelnen Zellkomponenten ermitteln.

Im Zellkern findet sich hauptsächlich DNS. Im Nucleolus entsteht RNS, welche an das Cytoplasma abgegeben wird.

In den Mitochondrien laufen die biologische Oxydation und energieliefernde Prozesse ab. Ihre wichtigste Aufgabe ist die Überführung des anorganischen Phosphats in energiereiche Phosphatbindungen mit Hilfe der beim Abbau der Substrate freiwerdenden Energie. Sie enthalten also vorwiegend säurelösliches Phosphat. Daneben finden sich reichlich Phosphatide, die am Aufbau der Mitochondrien beteiligt sind.

Die Mikrosomen, an denen die biologische Proteinsynthese abläuft, zeichnen sich durch einen hohen RNS-Gehalt aus.

Das Cytoplasma enthält anorganisches Phosphat, viele Phosphatester, die beim Abbau der Substrate entstehen, sowie energiereiche Phosphate und Nucleotide, welche an den dort ablaufenden enzymatischen Vorgängen beteiligt sind. Außerdem findet sich niedermolekulare RNS.

2. Der Phosphatgehalt und seine Verteilung nach Angaben der Literatur

a) In der Haut

Über den Gehalt der Haut an Phosphatverbindungen liegen Ergebnisse von drei Autoren vor. SCHMIDT und GREENBERG (3) geben für trockene Rattengesamthaut 405 - 812 mg % Gesamtphosphat an. SPIER und PASCHER (64) untersuchten die äußerste Schicht des Stratum corneum, das sogenannte Stratum disjunctum, von hautgesunden Menschen und bestimmten den Gehalt an anorganischem Phosphat mit 13 mg %, an Esterphosphat mit 16 mg % und an gesantsäurelöslichem Phosphat mit 45 mg % des Trockengewichtes. TABACHNIK (66) fand in der Meerschweinchenepidermis 0,06 %, das sind 60 mg % anorganisches Phosphat des Trockengewichtes, außerdem eine kleine, quantitativ nicht bestimmte Menge an säurelöslichem organischen Phosphat. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Bedeutungsvoll sind in diesem Zusammenhang die Arbeiten von LUDFORD (22) und KOOYMAN (23). KOOYMAN untersuchte in unterschiedlich dicken Hautschnitten von Handflächen und Fußsohlen den Gehalt an Phospholipoiden. Er konnte nachweisen, daß die basalen Epidermisschichten im Gegensatz zur Hornschicht eine relativ große Menge Phospholipoide enthalten. Seiner Ansicht nach steht deren Verminderung nach der Hautoberfläche zu mit der abnehmenden Stoffwechselaktivität der Zellen im Verlaufe der Keratinisierung in Zusammenhang. Diese Annahme wird erklärt durch die Arbeit LUDFORDs. Er fand in Schnitten von Mäuse-, Ratten- und Kaninchenhaut mit verschiedenen Färbemethoden in den Zellen der tiefen Epidermisschichten viele Mitochondrien, die, wie oben erwähnt, reich an Phospholipoiden sind, die Zellen des Stratum corneum wiesen dagegen kaum noch Mitochondrien auf.

b) In der Leber

Um einen Einblick zu gewinnen, wie sich andere, vollständiger untersuchte Gewebe verhalten, wurden die in der Literatur niedergelegten Ergebnisse über den Phosphatgehalt der Leber zusammengestellt. Die Leber als sehr zellreiches und mit vielen Enzymen ausgestattetes stoffwechselaktives Organ enthält dementsprechend relativ viel organisch gebundenes Phosphat. Davon ist der überwiegende Teil als säureunlösliches Phosphat in Nucleinsäuren und Proteinen enthalten. Der säurelösliche Anteil der Phosphatverbindungen der Leber, in dem sich die energiereichen Verbindungen befinden, wurde von verschiedenen Autoren untersucht.

(RAPOPORT et al. 14, LE PAGE 60, VENKATARAMAN et al. 63, SACKS 62, ALBAUM et al. 61, DERACHE et al. 56). Sie fanden in der Rattenleber anorganisches Phosphat, ATP, ADP, AMP, Kreatinphosphat, G-1-P, G-6-P, F-6-P, FDP und PGS. Der Gesamtphosphatgehalt wurde nicht bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Bei allen Autoren stimmen die Angaben für gesamtsäurelösliches und anorganisches Phosphat etwa überein. Dagegen differieren die Werte für die Phosphatester zum Teil sehr stark, manche fallen völlig aus dem Schwankungsbereich heraus. Da bei den meisten Untersuchungen Schwermetallfällungsmethoden angewandt wurden, mußten diese Werte untereinander vergleichbar sein. Allerdings sollte man annehmen, daß die mit den modernen enzymatischen Bestimmungsmethoden gewonnenen Ergebnisse dem wahren Gehalt am nächsten kommen.

Die Literaturangaben über den Phosphatgehalt der Menschenleber sind spärlich; sie beziehen sich auf Gesamt- und anorganisches Phosphat. LANG (2) fand für feuchte Menschenleber 300 - 400 mg % Gesamtphosphat und 18 - 35 mg % anorganisches Phosphat, das entspricht einem Anteil des anorganischen am Gesamtphosphat von 4 - 12 %. Die Untersuchungen von SCHMIDT und GREENBERG (3) ergaben dagegen für

feuchte menschliche Leber 241 mg % anorganisches Phosphat; das Gesamtphosphat wurde nicht bestimmt. ARON (4) fand für trockene Leber 1.280 mg % anorganisches Phosphat. Auch hier fehlt eine Angabe über den Gesamtphosphatgehalt. Nimmt man den durchschnittlichen Wassergehalt der menschlichen Leber mit 75 % an (CREMER und FÜHR, 26), so zeigt sich, daß die Ergebnisse von SCHMIDT und GREENBERG (3) und ARON (4) für das anorganische Phosphat etwa übereinstimmen, während LANG (2) dagegen einen extrem niedrigen Wert angibt. Siehe Tabelle 4.

Über den Gehalt der Leber an säureunlöslichem Phosphat existieren keine absoluten Werte. SCHNEIDER und POTTER (16) konnten in Versuchen über die Verteilung der Nucleinsäuren in den Zellfraktionen der Rattenleber zeigen, daß der DNS-Phosphor praktisch vollständig im Kern lokalisiert ist, während die Mikrosomenfraktion den größten Anteil an RNS-Phosphor hat. Diese Verteilung gilt, wie oben erwähnt, für alle Zellen. Nach Angaben von MUNTWYLER, SEIFTER und HARKNESS (17) enthält die Cytoplasmafraktion der Rattenleberzellen etwa dreimal soviel Gesamtphosphat wie die Kernfraktion, viermal soviel wie die Mitochondrienfraktion und ein Drittel mal soviel wie die Mikrosomenfraktion. Die Mikrosomen sind also am reichsten mit Phosphat ausgestattet.

Tabelle 1

Die Phosphatfraktionen der Haut nach Angaben der Literatur
(in mg % des Trockengewichtes)

Autor	Jahr	Species	Hautschicht	Phosphatfraktion	Wert
SCHMIDT und GREENBERG (3)	1935	Ratte	Gesamthaut	Gesamtphosphat	405 - 812
SPIER und PASCHER (64)	1955	Mensch	Stratum disjunctum	Anorg. Phosphat Esterphosphat Gesamtsäurelös- liches Phosphat	13,0 16,0 45,0
TABACHNIK (66)	1959	Meerschwein- chen	Epidermis	Anorg. Phosphat	60,0

Tabelle 2

Ergebnisse der Bestimmungen säurelöslicher Phosphatverbindungen der Rattenleber in der Literatur
(in mg % P des Trockengewichtes)

Autor	Jahr	Methode	Ges.säurel.P.	Anorg.P.	Organ.P.	Kreatin-P.	Leblier P. von ATP	Leblier P. v.ATP u. ADP	Stablier P. v.ATP u. ADP
(14) +	1943	Fällung mit Ba, Mg, Hg	346,3	59,3	-	-	52,6	-	-
(60) *	1948	Fällung mit Ba	374,1	43,0	271,0	28,3	-	-	-
(63) +	1950	Fällung mit Hg	244,0	78,0	-	-	8,0	-	-
(62) +	1951	Fällung mit Ca u. Ba	-	63,0	-	-	-	36,6	21,1
(61) +	1952	Enzym. Best.	255,4	59,3	152,6	16,7	-	-	-
(56) +	1956	Säulen- chromat.	-	150,0	-	-	-	24,1	-

Fortsetzung Tabelle 2

ATP	ADP	AMP	G-1-P	G-6-P	F-6-P	FDP	PGS	Hg-unlös.l.P.	Anzahl der untersuchten Ratten
-	-	-	-	-	-	-	15,4	91,6	10
0,82	34,1	11,5	4,3	43,7	2,5	1,7	18,9	-	2
-	-	-	-	-	-	-	-	106,0	10
-	-	16,1	6,0	11,8	-	-	11,1	-	2 Rassen: 1. 3 Tiere 2. 12 - 16 Tiere
24,6	3,5	7,8	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	17,9	20,4	12,4	-	-	-	-

+ Im Original sind die Werte in mg % des Feuchtgewichtes angegeben.

* Im Original sind die Zahlen in Mikromolen pro 100 g Feuchtgewicht angegeben.

Bei allen wurde der Wassergehalt der Rattenleber nach FENN (6) und Mc KAY und BERGMAN (10) mit 70 % angenommen.

Tabelle 5

Den in Tabelle 2 aufgeführten absoluten Werten wird die Prozentzahl gegenübergestellt.

(Gesamtsäurelösliches Phosphat = 100 %)

	vor Amorg.P.	Organ.P.	Kreatin-P.	labiler P. von ATP	ATP	ADP	AMP	G-1-P	G-6-P	F-6-P	FDP	PGS	Hg-un- lös1.P.
i)	17,1	-	-	15,2	-	-	-	-	-	-	-	4,4	26,1
ii)	11,5	72,4	7,5	-	0,2	9,1	3,0	1,1	11,6	0,6	0,5	5,0	-
iii)	31,9	-	-	3,5	-	-	-	-	-	-	-	-	43,4
iv)	22,8	59,6	6,5	-	9,5	1,3	3,0	-	-	-	-	-	-

Tabelle 4

Ergebnisse in der Literatur über den Phosphatgehalt der Menschenleber
(in mg % des Trockengewichtes)

Autor	Jahr	Gesamtposphat	Anorgan. Phosphat
LANG (2) +	1955	1.400	112
SCHEIDT und GREENBERG + (3)	1935	-	964
ARON (4)	1935	-	1.280

+ Bei beiden Autoren beziehen sich die Angaben im Original auf feuchte Leber. Um zu vergleichbaren Zahlen zu kommen, wurde aus dem Mittelwert auf Trockengewicht umgerechnet. Dabei wurde der Wassergehalt mit 75 % angenommen.
(CREMER und FÜHR, 26).

II. Eigene Untersuchungen

Wie schon erwähnt, finden sich in der Literatur nur wenige und unvollständige Angaben über den Phosphatgehalt der Haut. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den Gesamtposphatgehalt der Haut und die Verteilung auf die einzelnen Phosphatfraktionen zu bestimmen und mit den in der Leber gefundenen Werten zu vergleichen.

Die Anteile der Phosphatfraktionen am Gesamtposphat in der Haut interessieren auch deswegen, weil man daraus auf die dort ablaufenden Stoffwechselprozesse schließen kann. Andererseits kann der Phosphatgehalt, insbesondere der Nucleinsäurephosphor, bei Stoffwechseluntersuchungen als Bezugsgröße zugrunde gelegt werden.

Es wurden zunächst Gesamtposphat, säurelösliches Phosphat und anorganisches Phosphat der Rattenhaut bestimmt, anschließend das säurelösliche Phosphat mit Hilfe der Papierchromatographie weitgehend in die einzelnen Verbindungen aufgetrennt und diese auf enzymatischem Wege quantitativ bestimmt. Die gleichen Untersuchungen wurden an Rattenleber durchgeführt. Die Bestimmungen wurden an gesunden männlichen Albinoratten verschiedener Rassen vorgenommen, die zwischen 150 und 250 g wogen und unter gleichen Versuchsbedingungen standen.

1. Phosphatgehalt der Rattenhaut

a) Gesamtposphat der Rattenhaut

Die Bestimmung des Gesamtposphats der Rattenhaut wurde an 21 Tieren durchgeführt und ergab einen Mittelwert von 289,84 mg % P für trockene Substanz mit einer Streuung von $\pm 45,05$. (Minimalwert 164,25, Maximalwert 487,35 mg %) Das Ergebnis liegt erheblich niedriger als das von SCHMIDT und GREENBERG (3), die 405 - 812 mg % P des Trockengewichts fanden. (s. Tabelle 1) Die einzelnen Werte sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5

Gesamtphosphatgehalt der Rattenhaut
(in mg % P des Trockengewichtes)

Versuchs-Nr.	Gesamtphosphatgehalt
1	274,73
2	220,15
3	239,89
4	305,13
5	311,53
6	487,35
7	277,16
8	209,79
9	262,09
11	301,12
12	326,66
13	278,66
14	368,20
15	334,84
16	238,64
17	164,25
27	274,53
28	299,37
29	311,70
30	275,30
32	325,63

Der Gesamtphosphatgehalt wurde in folgende Fraktionen unterteilt: gesamtsäurelösliches Phosphat, das sich aus säurelöslichem organischen und anorganischem Phosphat zusammensetzt und säureunlösliches organisches Phosphat. Wir haben zunächst das gesamtsäurelösliche Phosphat bestimmt. Die Menge des säurelöslichen organischen Phosphats ergibt sich aus der Differenz zwischen dem gesamtsäurelöslichen und dem anorganischen Phosphat, die Menge des säureunlöslichen Phosphats aus der Differenz zwischen Gesamtphosphat und gesamtsäurelöslichem Phosphat.

b) Gesamtsäurelösliches Phosphat der Rattenh a u t

Bei 21 Ratten ergab sich ein Gehalt der Haut an säurelöslichem Phosphat von durchschnittlich 101,62 mg % P des Trockengewichtes; das sind 35,06 % des Gesamtphosphats. (Streuung $\pm$ 49,69, Minimalwert 21,6 mg %, Maximalwert 259,25 mg %) Die zum Teil großen Abweichungen hängen möglicherweise mit dem unterschiedlichen Alter der untersuchten Tiere zusammen, außerdem waren nicht immer Ratten der gleichen Rasse verfügbar. In der Literatur sind keine Vergleichswerte vorhanden (s. Tabelle 6).

e) Anorganisches Phosphat der Rattenh a u t

Das anorganische Phosphat wurde an 18 Ratten bestimmt. Die Werte variieren zwischen 10 und 36 mg % P des Trockengewichtes. Der Mittelwert beträgt 19,1 mg %, die Streuung $\pm$ 5,42. Vier Werte, die extrem niedrig lagen und bei denen die Abscheidung mit Sicherheit nicht quantitativ erfolgte, wurden nicht aufgeführt. Das anorganische Phosphat stellt 18,7 % des gesamtsäurelöslichen und 6,5 % des Gesamtphosphats dar. Entsprechende Untersuchungsergebnisse liegen in der Literatur nicht vor. Tabelle 7.

Tabelle 6

Gesamtsäurelösliches Phosphat der Rattenhaut

(in mg % P des Trockengewichtes)

Versuchs-Nr.	Gesamtsäurelösl.-P.	% des Gesamt.-P.
2	156,11	70,6
4	106,78	35,0
5	167,60	53,6
6	114,33	24,1
7	215,62	78,0
8	51,21	24,2
9	111,84	42,5
10	55,97	-
12	83,48	25,2
13	45,98	16,4
14	63,88	17,3
17	21,60	12,6
18	34,87	-
19	40,97	-
26	127,13	24,9
27	166,99	60,7
28	100,42	33,5
29	259,25	83,1
30	68,14	24,7
31	29,62	-
32	112,42	34,5

Tabelle 7

Anorganisches Phosphat der Rattenhaut

(in mg % P des Trockengewichtes)

Versuchs-Nr.	Wahrer anorg.P.	% des ges.säurel.P.	% des Ges.-P.
2	25,44	16,28	11,5
5	32,75	19,58	10,5
8	30,60	60,3	14,6
12	36,72	44,4	11,2
13	15,52	34,1	5,6
14	21,02	32,3	5,7
15	28,95	-	8,3
17	11,74	54,3	-
18	15,33	43,9	-
19	22,34	54,5	-
20	10,70	-	-
21	16,64	-	-
22	10,00	-	-
23	12,70	-	-
24	10,08	-	-
25	13,68	-	-
26	13,98	6,4	2,7
27	15,74	9,4	5,7

Tabelle 8 bringt zusammenfassend die Aufteilung des Gesamtphosphats der Rattenhaut auf die einzelnen Phosphatfraktionen und zwar sowohl die Absolutwerte als auch jeweils den relativen Anteil.

Tabelle 8

Anteile der Phosphatfraktionen am Gesamtphosphat in der
Rattenh a u t

Mittelwerte (in mg % des Trockengewichtes)

Gesamt-P.	Ges.säurel.P.	Anorg.P.	Säurel.org.P.	Säureunl.P.
289,84	101,62	19,1	84,83	188,22
100 %	35,06 %	6,5 %	29,2 %	64,4 %

Die größte Fraktion des Gesamtphosphats in der Rattenhaut stellt das säureunlösliche Phosphat mit 64,4 % dar, gefolgt vom gesamtsäurelöslichen Phosphat mit 35,06 % und vom säurelöslichen organischen Phosphat mit 29,2 %, während des anorganische Phosphat mit 5,7 % den kleinsten Teil ausmacht.

2. Phosphatgehalt der Rattenl e b e r

a) Gesamtphosphat der Rattenleber

Wir fanden bei 20 Tieren einen Mittelwert von 1150,15 mg % P; die Streuung beträgt $\pm 138,3$. (Minimalwert 801,37, Maximalwert 1419,56 mg % P.) Siehe Tabelle 9. Untersuchungsergebnisse anderer Autoren liegen nicht vor, so daß keine Vergleichsmöglichkeit gegeben ist.

Auch in der Leber wurden gesamtsäurelösliches und anorganisches Phosphat bestimmt.

b) Gesamtsäurelösliches Phosphat der Rattenleber

Die Ergebnisse für das säurelösliche Phosphat der Leber bringt Tabelle 10. Bei 20 Tieren wurde ein Mittelwert von 343,43 mg % P gefunden. Die Streuung beträgt $\pm 59,6$, der durchschnittliche Anteil am Gesamtphosphat 29,86 %. (Minimalwert 235,66, Maximalwert 486,01 mg %.) Unsere Zahlen stimmen gut mit den Angaben von RAPOPORT et al. (14), LE PAGE (60), ALBAUM et al. (61) und VENKATARAMAN et al. (63) überein. Vergleiche Tabelle 2.

c) Anorganisches Phosphat der Rattenleber

Für das anorganische Phosphat der Leber fanden wir einen Mittelwert von 71,61 mg % P mit einer Streuung von $\pm 17,99$. (Minimalwert 24,61, Maximalwert 117,47 mg % P.) Es wurden 17 Ratten untersucht. Der durchschnittliche Anteil des anorganischen Phosphats am Gesamtphosphat liegt bei 6,13 %, der am gesamtsäurelöslichen Phosphat bei 20,5 %.

Unsere Ergebnisse (Tabelle 11) liegen im Bereich der Werte von RAPOPORT et al. (14), VENKATARAMAN et al. (63), SACKS (62) und ALBAUM et al. (61), während DERACHE et al. (56) dagegen eine relativ hohe Zahl angeben (Tabelle 2).

Tabelle 9

Gesamtposphatgehalt der Rattenleber
(in mg % P des Trockengewichtes)

Versuchs-Nr.	Gesamtposphatgehalt
4	988,09
5	1337,57
6	1358,34
7	1130,46
8	1020,21
9	1116,14
10	1182,55
11	1364,36
12	1204,80
13	1145,43
17	1192,96
18	1118,58
19	1356,20
26	1419,56
27	801,37
28	996,88
29	1323,09
30	859,16
31	1040,23
32	1057,05

Tabelle 10

Gesamtsäurelösliches Phosphat der Rattenleber

(in mg % P des Trockengewichtes)

Versuchs-Nr.	Gesamtsäurelös. P.	% des Gesamt-P.
4	420,55	42,5
5	295,80	22,1
6	361,74	26,6
7	342,50	30,3
8	235,66	23,1
9	279,30	25,0
10	313,06	26,4
11	361,88	26,5
12	270,68	22,5
13	257,94	22,5
14	291,51	-
15	313,03	-
17	275,73	23,1
18	555,87	49,7
19	338,27	24,9
26	384,41	27,0
27	414,67	51,7
28	318,25	31,9
29	341,90	25,8
32	486,01	45,9

Tabelle 11

Anorganisches Phosphat der Rattenleber

(in mg % P des Trockengewichtes)

Versuchs-Nr.	Wahrer anorg.-P.	% des Ges.-säure- lösl.-Phosphats	% des Gesamtphosphat
4	83,73	19,6	8,5
5	41,32	15,4	3,4
6	37,89	10,5	2,78
7	68,26	20,0	6,00
8	54,30	22,4	5,3
10	24,01	8,4	2,2
11	71,76	19,8	5,25
12	99,27	35,8	8,25
13	64,72	25,9	5,65
14	93,13	-	-
15	92,38	-	-
17	70,29	25,4	5,85
18	117,47	21,0	10,5
19	93,68	28,0	6,9
26	67,80	17,6	4,9
27	74,41	17,9	9,3
30	63,00	7,05	7,3

In Tabelle 12 ist die Verteilung des Gesamtphosphats auf die einzelnen Fraktionen in der Rattenleber in absoluten und relativen Werten dargestellt.

Tabelle 12

Anteil der Phosphatfraktionen am Gesamtphosphat in der
Rattenleber

Mittelwerte (in mg % des Trockengewichtes)

Gesamt-P.	Gesamtsäurel.P.	Anorgan.P.	Säurel.org.P.	Säureunl.P.
1150,15	343,43	71,61	271,82	806,72
100 %	29,86 %	6,13 %	23,63 %	70,14 %

Auch in der Rattenleber hat das säureunlösliche Phosphat mit 70,14 % den größten Anteil am Gesamtphosphat; es folgen das gesamtsäurelösliche Phosphat mit 29,86 %, das säurelösliche organische Phosphat mit 23,63 % und das anorganische Phosphat mit 6,13 %.

3. Gegenüberstellung der eigenen Werte für Rattenhaut und -leber

Die Absolutzahlen der für Rattenhaut und -leber ermittelten Ergebnisse sind in Tabelle 13 zusammengefaßt. Wie daraus hervorgeht, beträgt der Phosphatgehalt der Rattenleber für alle Fraktionen das Drei - Vierfache, desjenigen der Rattenhaut. Das stimmt überein mit der Tatsache, daß auch die Stoffwechselaktivität der Leber ein Vielfaches der Aktivität der Haut darstellt. So wird z. B. für Rattenleber ein Q_{O_2} - Wert von 10 gemessen (KREBS, 44), während Rattenhaut Q_{O_2} - Werte von 0,5 - 1,45 aufweist (45 - 52).

Tabelle 13

Mittelwerte der Phosphatfraktionen in Haut und Leber der Ratte

(in mg % P des Trockengewichtes)

	Gesamt-P.	Ges.säurel.P.	Anorg.P.	Säurel. org. P.	Säureunl.P.
Haut	289,84	101,62	16,79	84,83	188,22
Leber	1150,15	343,43	71,61	271,82	806,72

Vergleicht man die prozentuale Aufteilung der einzelnen Phosphatfraktionen in Haut und Leber, so findet man Werte, die in engen Grenzen übereinstimmen. (Siehe auch Tabelle 8 und 12.) Offenbar laufen die Stoffwechselprozesse in Haut und Leber in gleicher Weise ab und unterscheiden sich nur in Bezug auf die Aktivität. Tabelle 14 bringt die prozentualen Anteile der Fraktionen am Gesamtphosphat, Tabelle 15 die prozentuale Verteilung innerhalb des gesamtsäurelöslichen Phosphats in Rattenhaut und -leber.

Tabelle 14

Prozentuale Anteile der einzelnen Phosphatfraktionen am
Gesamtposphat in Rattenhaut und Rattenleber

Gesamtposphat = 100 %

	Gesamtsäurel. P.	Anorg. P.	Säurel. organ. P.	Säureunl. P.
Haut	35,06 %	6,5 %	29,2 %	64,94 %
Leber	29,86 %	6,13 %	23,73 %	70,14 %

Tabelle 15

Prozentuale Verteilung der Phosphatfraktionen innerhalb des
gesamtsäurelöslichen Phosphats von Rattenhaut und Rattenleber

Gesamtsäurelösliches Phosphat = 100 %

	Anorgan. Phosphat	Säurel. organ. Phosphat
Haut	16,5 %	83,5 %
Leber	20,5 %	79,5 %

In Tabelle 16 stellen wir unsere Werte den entsprechenden Literaturangaben gegenüber. Der Vergleich zeigt, daß die eigenen Ergebnisse im wesentlichen mit denen der angeführten Autoren übereinstimmen.

Tabelle 16

Literaturangaben und eigene Werte über den Phosphatgehalt in Rattenhaut und Rattenleber

(in mg % P des Trockengewichtes)

Literaturangaben				Eigene Werte			
Autor	Gesamt-P.	Ges.säurel.P.	Anorg.P.	Gesamt-P.	Ges.säurel.P.	Anorg.P.	
Rattenhaut	(3)	405-812	-	-	289,84	101,62	19,1
Rattenleber	(14)	-	346,3	59,3	1150,15	343,43	71,61
	(60)	-	374,1	43,0			
	(63)	-	244,0	78,0			
	(61)	-	255,4	59,3			
	(62)	-	-	63,0			
	(56)	-	-	150,0			

4. Chromatographische Auftrennung des säurelöslichen Phosphats in Haut und Leber

Nach der Bestimmung von Gesamtphosphat, gesamt-säurelöslichem Phosphat und anorganischem Phosphat wurde das säurelösliche Phosphat durch zweidimensionale Papierechromatographie weiter aufgetrennt. Es konnten neben anorganischem Phosphat in Rattenhaut und -leber die fünf folgenden Verbindungen identifiziert werden: ATP, ADP, AMP, FDP und PGS.

Es findet sich also auch in der Zusammensetzung des gesamt-säurelöslichen Phosphats eine Übereinstimmung zwischen Haut und Leber.

DERACHE et al. (56) trennten P-haltige Verbindungen im säurelöslichen Extrakt von Rattenleber durch Säulenchromatographie auf, nachdem ATP zuerst an Mineralkohle adsorbiert worden war. Sie konnten G-1-P, G-6-P und F-6-P nachweisen (siehe auch Tabelle 2). BROOKS et al. (50) inkubierten Hautschnitte von Meerschweinchen in Glucose und radioaktiv markiertem P und trennten die gebildeten Phosphatester papierechromatographisch auf. Sie fanden mittels Radioautographie 14 Phosphatester, darunter ATP, ADP, AMP, FDP und 3-PGS. Von WOOD (65) wird eine differenzierte Methode zur papierechromatographischen Trennung von P-haltigen säurelöslichen Verbindungen beschrieben, bei welcher fünf verschiedene Lösungsmittel verwandt werden. Auf diese Weise konnte er in Rattenleber u. a. ATP, ADP, G-1-P, F-6-P und FDP identifizieren. Die Tatsache, daß wir nur fünf Verbindungen nachweisen, beruht darauf, daß unsere Methode der zweidimensionalen Papierechromatographie wesentlich weniger empfindlich ist. Es wurde auf eine weitergehende chromatographische Auftrennung verzichtet, da die Chromatographie nur als Orientierung für die anschließend durchzuführende enzymatische Bestimmung dienen sollte. In Tabelle 17 sind die in der Literatur angeführten chromatographisch nachgewiesenen Phosphatverbindungen in Meerschweinchenhaut und Rattenleber sowie die eigenen Ergebnisse zusammengestellt.

Tabelle 17

Chromatographisch nachgewiesene Verbindungen innerhalb des gesamtäurelöslichen Phosphats von
Haut und Leber

Literaturangaben und eigene Ergebnisse

Literaturangaben

Meerschweinchenhaut

Rattenleber

Rattenleber

Rattenhaut

Rattenleber

BROOKS' (30)

WOOD (65)

DERACHE
et al. (56)

Anorg. P.

ATP

ADP

AMP

G - 1 - P

G - 6 - P

FDP

F - 6 - P

3-PGS

2-Desoxyglucose-6-P

Uridindiphosphat

Guanosindiphosphat

Phosphoenolthreonsäure

Mannose-6-Phosphat

Glucosamin-6-Phosphat

1,5-Anhydro-d-Glucitol-6-Phosp.

Pyrophosphat

Anorg. P.

ATP

ADP

G-1-P

FDP

F-6-P

Kreatinphosphat

Dihydroxyacetonphosp.

Guanosintriphosphat

ATP

G-1-P

G-6-P

F-6-P

(G-6-P)⁺

FDP

(PGS)^{*}

Anorg. P.

ATP

ADP

Anorg. P.

ATP

ADP

(G-6-P)⁺

FDP

(PGS)^{*}

5. Enzymatische Bestimmung der einzelnen Phosphatverbindungen des säurelöslichen Phosphats

Anschließend wurde das säurelösliche Phosphat von Rattenhaut und -leber mit Hilfe enzymatischer Methoden auf seine Phosphatverbindungen quantitativ untersucht. Dabei konnte zusätzlich G-6-P nachgewiesen werden, welches auf dem Chromatogramm mit dem Fleck von AMP vergesellschaftet ist. Ein Vergleich der mittleren Rf-Werte von AMP und G-6-P zeigt, daß diese in beiden Lösungsmitteln nahe beieinander liegen. Eine enzymatische Bestimmung des chromatographisch als PGS identifizierten Flecks war nicht möglich, offenbar läuft hier eine andere Verbindung mit dem gleichen Rf-Wert. Tabelle 18 gibt die Ergebnisse der quantitativen enzymatischen Bestimmung wieder.

Während das Verhältnis von Gesamtphosphat zu gesamtsäurelöslichem und anorganischem Phosphat für Rattenhaut und -leber das gleiche ist, ergeben sich in der Relation der einzelnen Phosphatverbindungen des säurelöslichen organischen Phosphats doch größere Unterschiede zwischen Haut und Leber. So ist z. B. der Anteil der Adeninnucleotide und von G-6-P in der Haut wesentlich geringer als in der Leber. Das würde sich einfach dadurch erklären lassen, daß die Stoffwechselaktivität in der Haut geringer ist. Auffallend ist aber der hohe Gehalt der Haut an FDP. Da bekannt ist, daß die oxydativen energieliefernden Vorgänge in Haut und Leber qualitativ die gleichen sind, muß man vermuten, daß es sich um Abweichungen quantitativer Art im Stoffwechselablauf handelt. Gestützt wird diese Annahme durch Ergebnisse von Ruth KIMMELSTIEL-FREINKEL (38), die zeigen konnte, daß im Gegensatz zu anderen Geweben in der Haut die Glycolyse den bevorzugten Weg zur Energiegewinnung darstellt. Sie fand in in-vitro-Versuchen mit radioaktiv markierter Glucose unter aeroben Bedingungen 70 % der

eingesetzten Glucose als Milchsäure wieder. Außerdem wies sie nach, daß nur 1 % des eingesetzten Substrats den Citronensäurecyclus und 1,4 % den Hexosemonophosphatweg durchlaufen. Diese Ergebnisse bestätigen auch die Annahme BULLOUGH's (41), der auf Grund des hohen Glycogengehalts in noch nicht verhornten Epithelzellen schloß, daß die Zellen infolge geringer O_2 - Versorgung ihre Energie via Glycolyse gewinnen müssen. Auch BRADFIELD (40) konnte zeigen, daß junge Epithelzellen von heilenden Wunden große Mengen Glycogen enthalten, welches mit Beginn der Verhornung verschwindet. Er nimmt deshalb an, daß dieses Glycogen durch glycolytischen Abbau als Energiequelle bei der Keratinbildung benutzt wird.

Mit Hilfe der Arbeit von KIMMELSTIEL - FREINKEL (38) lassen sich auch unsere Werte interpretieren. Die Tatsache, daß die Haut ihre Energie vorwiegend via Glycolyse gewinnt, erklärt den niedrigen Adeninnucleotidgehalt. Denn beim Abbau eines Mols Glucose via Glycolyse werden nur 2 Mole ATP gebildet, während ein Mol Glucose, das im Citronensäurecyclus und der Atmungskette vollständig oxydiert wird, 15 Mole ATP liefert. Gleichzeitig wird dadurch auch der hohe FDP-Gehalt der Haut erklärt, denn FDP stellt ein Zwischenprodukt beim glycolytischen Abbau des Glycogens dar und ist deshalb in wesentlich größerer Menge als in der Leber vorhanden. Der relativ niedrige G-6-P - Gehalt der Haut wird möglicherweise dadurch verursacht, daß nur 1,4 % der Glucose über den Hexosemonophosphatweg abgebaut werden (38), während in der Leber 50 % der Glucose den Glucose-6-Phosphatcyclus durchlaufen (BLOOM und STETTER, 54).

Abbau der Glucose im intermediären Stoffwechsel in Haut und Leber

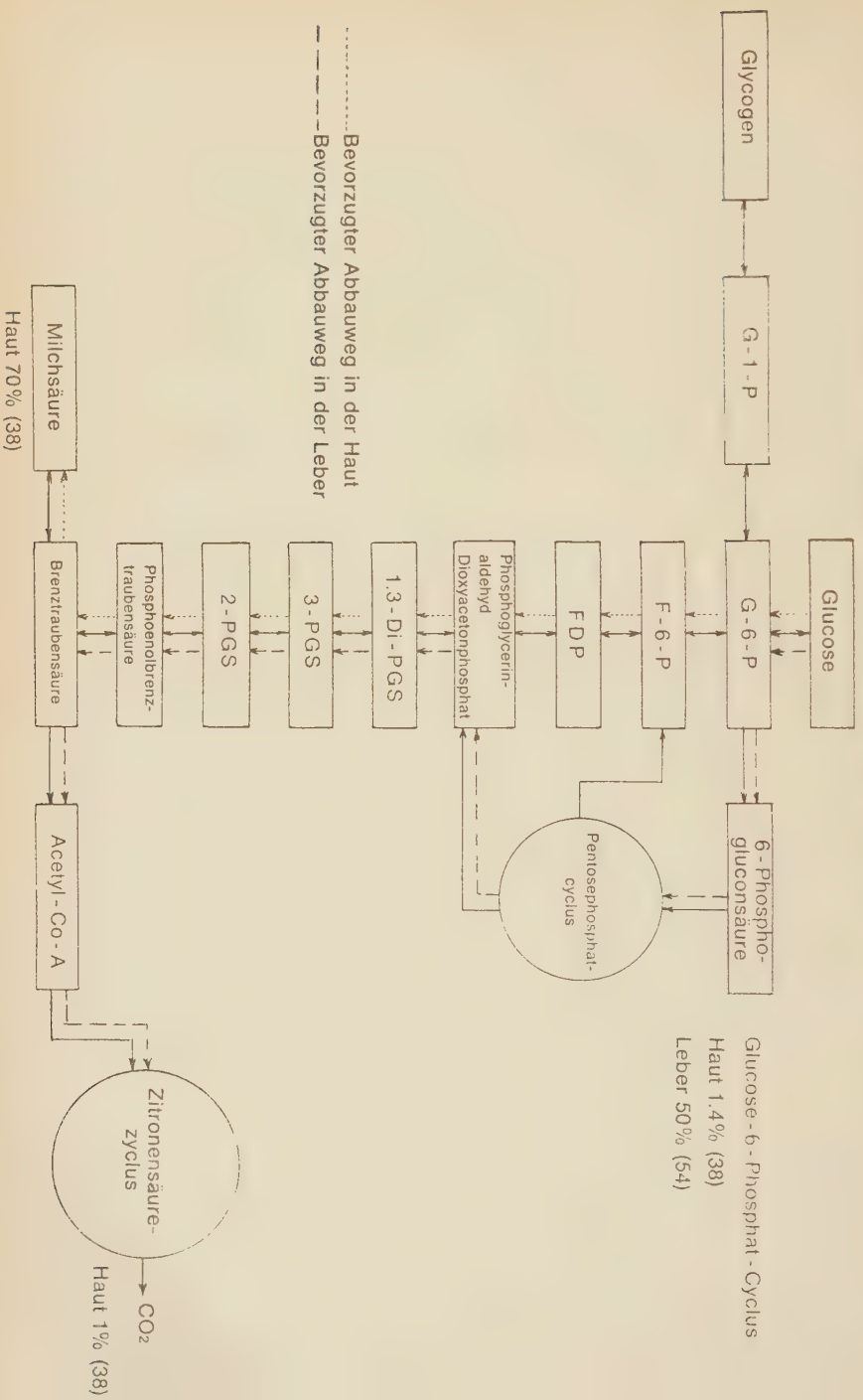


Tabelle 18

Phosphorgehalt der mit chemischen und enzymatischen Methoden nachgewiesenen Verbindungen des säurelöslichen Phosphats von Rattenhaut und -leber

(in mg % des Trockengewichtes)

	<u>Rattenhaut</u>		<u>Enzymatische Analysen</u>				
	Chemische Analysen	Anorgan.P.	ATP	ADP	AMP	G-6-P	FDP
	Säurel.P.						
Mittelwert	32,4	17,0	1,08	0,55	0,76	0,44	1,60
Streuung	54,3	29,7	0,46	1,28	0,41	0,37	2,10
	27,3	14,3	nicht meßb. ⁺	0,44	0,16	0,28	0,57
	28,8	15,2	0,35	0,80	0,69	0,30	1,95
	27,0	17,3	0,43	0,81	0,40	0,26	1,80
Mittelwert	33,9	18,7	0,58	0,78	0,48	0,33	1,60
Streuung	± 8,1	± 4,6	± 0,25	± 0,22	± 0,19	± 0,06	± 0,21

Rattenleber

	257,7	78,4	19,3	20,4	16,3	7,9	1,75
	236,8	75,9	10,8	17,2	16,1	3,5	1,1
	228,1	45,8	16,7	22,9	12,3	5,3	2,8
	187,0	51,8	11,9	18,6	25,2	6,2	1,2
	248,0	72,9	nicht bestimmt	20,4	14,5	10,3	1,8
Mittelwert	231,7	64,9	14,6	19,9	16,9	6,6	1,7
Streuung	± 19,3	± 12,9	± 3,4	± 1,7	± 3,3	± 1,9	± 0,4

+ : Bei der Haut ist eine weitere Konzentration des Extraktes, die eine bessere ATP-Bestimmung erlauben würde, nicht möglich, da die enzymatische Bestimmung dadurch zu sehr gestört wird.

Tabelle 19

Prozentuale Anteile der nachgewiesenen Verbindungen am säurelöslichen Phosphat

Säurelösliches Phosphat = 100 %

	Anorgan. P.	ATP	ADP	AMP	G-6-P	FDP
Rattenhaut	53,0 %	3,3 %	1,7 %	2,3 %	1,3 %	5,0 %
	54,6 %	0,8 %	2,3 %	0,7 %	0,68 %	3,8 %
	53,0 %	nicht meßbar	1,6 %	0,6 %	1,0 %	2,1 %
	52,2 %	1,21 %	2,77 %	2,38 %	1,03 %	6,75 %
	63,3 %	1,56 %	2,99 %	1,47 %	0,93 %	6,65 %
	Durchschnitt	55,2 %	1,38 %	2,27 %	1,5 %	0,99 %
Rattenleber	30,0 %	7,5 %	7,9 %	6,3 %	3,0 %	0,6 %
	42,0 %	4,5 %	7,2 %	6,8 %	1,4 %	0,4 %
	20,0 %	7,3 %	10,0 %	5,3 %	2,3 %	1,2 %
	27,0 %	6,3 %	10,0 %	13,4 %	3,2 %	0,6 %
	29,0 %	nicht best.	8,2 %	5,8 %	4,1 %	0,7 %
	Durchschnitt	29,6 %	6,4 %	8,66 %	7,52 %	2,8 %

III. Experimenteller Teil

1. Bestimmung des Wassergehaltes

Je ein Stück Rattenhaut und -leber, etwa 1 g, wurde feucht gewogen, bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und anschließend 12 Stunden im Exsikkator aufbewahrt. Aus dem Gewichtsverlust wurde der Wassergehalt berechnet. Wir fanden einen mittleren Wassergehalt der Ratten - h a u t von 63,9 % mit einer Streuung von 1,78. Einzelwerte siehe Tabelle 20. A. NADEL (27) gibt für menschliche Haut eine Schwankungsbreite von 63,8 bis 70,6 % an. Unser Mittelwert für den Wassergehalt der Rattenl e b e r beträgt 72,3 %, die Streuung 1,72. (s. Tabelle 21) Mc KAY und BERGMAN (10) und FENN (6) fanden in der Rattenleber einen Wassergehalt von 67,9 bis 71,3 %. Nach CREMER und FÜHR (26) enthält menschliche Leber durchschnittlich 75 % Wasser.

2. Aufarbeitung des Gewebes

Die Rückenhaut der Ratte wird rasiert und ein möglichst großes Stück, etwa 4 x 8 cm, entnommen. Die Subentis wird bis auf das Corium sauber abpräpariert. Ungefähr die Hälfte der Haut wird zur Bestimmung des säurelöslichen Phosphats, ein Viertel zur Bestimmung des Gesamtphosphats und ein Viertel zur Trockengewichtsbestimmung verwandt. Die entsprechenden Hautstücke legt man auf vorgewogene Uhrglasschälchen und wägt dann möglichst schnell. Anschließend wird die ganze Leber entnommen und mengenmäßig entsprechend der Haut auf Uhrglasschälchen gelegt und gewogen.

Tabelle 20

Wassergehalt der Rattenhaut

Versuchs-Nr.	%
1	64,7
2	61,4
3	61,6
4	62,4
5	66,5
6	64,2
7	65,1
8	60,2
9	63,5
10	64,8
11	70,0
12	65,5
13	63,4
14	62,9
15	67,6
16	66,2
17	64,3
18	65,3
19	67,1
20	62,9
21	64,6
22	66,2
23	63,4
24	61,7
25	62,2
26	61,3
27	62,7
28	64,6
29	64,2
30	63,4
31	61,0
32	60,8

Wassergehalt der Rattenleber

Versuchs-Nr.	%
4	74,8
5	73,8
6	75,3
7	74,1
8	67,7
9	71,2
10	70,6
11	75,0
12	72,3
13	68,9
14	72,2
15	73,1
16	71,5
17	69,3
18	70,4
19	73,4
26	72,7
27	73,9
28	71,4
29	74,8
30	72,3
31	70,1
32	74,9

Sowohl Gesamtphosphat als auch säurelösliches Phosphat liegen als gebundenes Phosphat vor und müssen durch Veraschen freigesetzt werden. Das Gewebstück zur Bestimmung des Gesamtphosphats wird mit der Schere zerkleinert und in einem Erlenmeyerkolben mit 3 ml Nitriersäure auf kleiner Flamme erhitzt, bis die braunen Dämpfe abgeraucht sind. In einem zweiten Kolben werden 3 ml Nitriersäure als Blindwert angesetzt und entsprechend behandelt. Nach dem Abkühlen gibt man wieder 3 ml Nitriersäure zu und erhitzt. Dies wird so lange wiederholt, bis die Flüssigkeit klar ist. Man spült dann die Gefäßwände mit 3 ml Aqua dest. ab, erhitzt nochmals, um etwa weiter oben im Kolben haftende Substanzen mitzuerfassen. Nach dem Abkühlen gibt man wieder 3 ml Aqua dest. zu und kocht fünf Minuten, ohne einzudampfen. Dadurch wird die gebildete Metaphosphorsäure zerstört. Um ein schnelles Klarwerden der Flüssigkeit zu erreichen, kann man statt Nitriersäure 3 ml Perhydrol zugeben, nachdem zweimal mit Nitriersäure erhitzt wurde. Zum Schluß wird die Flüssigkeit mit Na OH gegen zwei Tropfen p-Nitrophenol neutralisiert, quantitativ in einen 50 ml Meßkolben übergeführt und mit Aqua dest. aufgefüllt.

Zur Bestimmung des säurelöslichen Phosphats wird das entsprechende Gewebstück in der Tiefkühltruhe kurz gefroren und mit einem Skalpell zerschnitten. Die Schnitzel werden in einer vorgekühlten Reibschale mit möglichst wenig teilweise gefrorener Trichloroessigsäure und Quarzsand verrieben und sofort filtriert. Das Filtrat wird quantitativ in einen 25 ml Meßkolben übergeführt und mit Trichloroessigsäure aufgefüllt. In diesem Filtrat wird sowohl das gesamt-säurelösliche als auch das anorganische Phosphat bestimmt. 5 ml des Filtrats und ein Blindwert von 5 ml Trichloroessigsäure werden im Erlenmeyerkolben verascht wie oben angegeben. Nach Beendigung des Veraschens wird neutralisiert,

in einen 50 ml Meßkolben übergeführt und mit Aqua dest. aufgefüllt. Zur Bestimmung des anorganischen Phosphats aus dem Trichloressigsäureextrakt muß sich dieses als freies anorganisches Phosphat abscheiden. Die Abscheidung erfolgt nach MATHISON (67), indem 10 ml des Trichloressigsäureextraktes in ein Zentrifugenglas gegeben werden, das vorher mit 1 ml 1 %-igem Ammoniak und 2 ml Magnesiumcitrat beschickt wurde. Das Zentrifugenglas läßt man über Nacht im Eisschrank stehen. Ein eingestellter dünner Glasstab fördert die Abscheidung der Magnesiumammoniumphosphatkristalle. Am nächsten Tag wird zentrifugiert und der Niederschlag mit 5 ml Ammoniak ausgewaschen.

5.. Kolorimetrische Bestimmung des Phosphats

Die Phosphatbestimmung erfolgte kolorimetrisch nach FISKE und SUBARROW (12). Von der zu untersuchenden Probe werden je nach dem zu erwartenden Phosphatgehalt 1 - 5 ml in einen 25 ml Meßzylinder gegeben und mit Aqua dest. auf 10 ml aufgefüllt. In jeden Ansatz pipettiert man 2 ml Ammoniummolybdatlösung und 1 ml Metolreduktionslösung, mischt und läßt genau 10 Minuten stehen. Nach Beendigung der Reduktionszeit werden je 4 ml Natriumacetatlösung zugegeben, gemischt und mit Aqua dest. auf 20 ml aufgefüllt. Nach 5 Minuten werden die Extinktionen im Photometer bei 578 Millimü und einer Schichtdicke von 20 mm gegen den Blindwert gemessen.

- a) Zur Bestimmung des Gesamtphosphats setzt man bei der Haut 2 ml, bei der Leber 1 ml der zu untersuchenden Probe und des jeweiligen Blindwertes ein und verfährt weiter wie oben.

- b) Zur Bestimmung des gesamtsäurelöslichen Phosphats werden ebenfalls bei der Haut 2 ml, bei der Leber 1 ml des Veraschungsgutes, dazu die entsprechenden Blindwerte, eingesetzt.

Die Magnesiumammoniumphosphatkristalle zur Bestimmung des anorganischen Phosphats löst man in 2 ml Ammoniummolybdat und spült in einen 25 ml Meßzylinder über. Blindwert sind in diesem Falle die zuzusetzen- den Reagentien. Die weitere Bestimmung erfolgt wie oben angegeben.

Erforderliche Reagentien:

1. Nitriersäure

25 ml Schwefelsäure D = 1,84 langsam unter Rühren in 75 ml Salpetersäure D = 1,40 einfließen lassen.

2. Ammoniummolybdatlösung

40,5 ml Schwefelsäure D = 1,84 langsam unter Rühren in 109 ml Wasser einfließen lassen, ergibt eine etwa 10 n Schwefelsäure. Während des Abkühlens 12,5 g feingepulvertes Ammoniummolybdat in etwa 100 ml Wasser lösen und nach dem Abkühlen in 125 ml der soeben hergestellten 10 n Schwefelsäure unter Rühren einfließen lassen. Mit Wasser auf 250 ml auffüllen.

3. Metolreduktionslösung

25 g feingepulvertes Kaliumpyrosulfit werden in etwa 60 ml Wasser gelöst. Danach löst man 0,2 g Metol in 10 ml Wasser, vereinigt beide Lösungen und füllt mit Wasser auf 100 ml auf. Abschließend wird die Metolreduktionslösung durch ein 12 cm Faltenfilter filtriert (die ersten 20 ml verwerfen) und ist dann in einer braunen Flasche aufzubewahren. Die Haltbarkeit beträgt mindestens 2 Wochen.

4. Natriumacetatlösung (2,5 molar)

85 g Natriumacetat in Wasser lösen und auf 250 ml auffüllen.

5. p - Nitrophenollösung

0,1 %-ige wässrige Lösung (Umschlagsgebiet pH 5,2 - 7,0 von farblos auf gelb).

6. Magnesiumcitrat

Man löst 40 g Zitronensäure in 500 ml Aqua dest. in der Hitze, trägt in die heiße Lösung 20 g Mg O ein und fügt nach dem Abkühlen 400 ml konzentriertes Ammoniak ($d = 0,88$) zu. Es wird mit Aqua dest. auf 1500 ml aufgefüllt und nach 24-stündigem Stehen filtriert.

4. Chromatographische Auftrennung des säurelöslichen Phosphate

a) Eindimensionale Chromatographie der Testsubstanzen

In jedem Falle erfolgt die Chromatographie auf Schleicher und Schüll-Papier 2043 b, Größe der Bogen 25 x 25 cm. Zur Entfernung der Schwermetallionen wird das Papier nach der Vorschrift von EGGLESTON und HEMS (21) nacheinander in drei Wannen mit einer 0,2 %-igen Lösung von Äthylendiamintetraessigsäurem Natrium (EDTA) gewaschen, im Trockenschrank getrocknet und bis zum Gebrauch zwischen zwei Platten aus fester Pappe aufbewahrt. Auf die Startlinie, die 4 cm vom unteren Rand des Papiers entfernt ist, werden im Abstand von ca. 3 bis 4 cm je 0,01 ml der vorbereiteten Testsubstanzen, die in 0,01 ml 5 Gamma

Phosphor enthalten, mit einer feinen Pipette aufgetragen und mit kaltem Föhn getrocknet. Das Papier wird zu einem Zylinder geformt, mit Klammern zusammengehalten, ohne daß sich die Bänder berühren und in ein Chromatographiegefäß mit gut schließendem Deckel eingestellt, dessen Boden etwa 0,5 cm hoch von dem Lösungsmittel bedeckt ist. Zur schnelleren Sättigung der Atmosphäre legt man einen Bogen Filterpapier, der in das Lösungsmittel eintaucht, innen an die Wand des Gefäßes an. Wir verwendeten ein saures und ein alkalisches Lösungsmittel.

Saures Lösungsmittel: 3 Teile Isopropyläther,
2 Teile 88 %ige Ameisensäure

Alkalisches Lösungsmittel: 1 Teil n-Propanol,
1 Teil konz. Ammoniak.

Die Verwendung von Propanol-Ammoniak-Wasser im Verhältnis 6 : 3 : 1, wie z. B. bei WOOD (65) angegeben, brachte keine genügende Trennung der Substanzen. Die Laufzeit in einem Lösungsmittel beträgt etwa 5 bis 6 Stunden. Das saure Lösungsmittel muß vorher zur Sättigung der Atmosphäre drei Tage stehen. Wenn die Lösungsmittelfront etwa 2 cm unterhalb des oberen Papierrandes angelangt ist, wird das Chromatogramm herausgenommen und im Trockenschrank getrocknet.

Zum Sichtbarmachen der Phosphatflecke werden die getrockneten Chromatogramme mit dem Reagens nach BANDURSKI und AXELROD (20) besprüht. Dabei tritt das anorganische Phosphat sofort als gelblicher Fleck zu Tage; zur Freisetzung des gebundenen Phosphats wird das Papier erhitzt, bis es anfängt brüchig zu werden. Durch Reduktionen im UV-Licht werden die Phosphatverbindungen als blaue Flecke sichtbar. Die Entwicklungsmethode nach ROSENBERG (32) mit Vanadylehlerid brachte ebenso wenig wie die nach BOREM (31) mit Chininsulfat die gewünschten Erfolge.

Herstellung des Molybdatreagens

5 ml 60 %-ige Perchlorsäure, 10 ml 1 n Salzsäure, 25 ml 4 %-iges Ammoniummolybdat werden gemischt und mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt.

Im sauren Lösungsmittel blieb ATP am Startpunkt zurück, während sich die übrigen Substanzen relativ gut trennten.

Bei den Versuchen von WOOD (65), der ebenfalls aufsteigend chromatographierte und Isopropyläther, n-Butanol und 90 %-ige Ameisensäure im Verhältnis 3 : 3 : 2 verwandte, waren die R_f-Werte von ATP, ADP und AMP gleich null. FDP, G-I-P, G-6-P und PGS weisen sehr niedrige R_F-Werte auf, die auch in ihrem Verhältnis zueinander nicht mit unseren Ergebnissen zu vergleichen sind. Im alkalischen Lösungsmittel, welches bei WOOD (65) aus Propanol, Ammoniak 0,88 und Wasser im Verhältnis 6 : 3 : 1 besteht, liegen absolute und relative Werte sämtlich außerhalb des Bereiches unserer Zahlen. In Tabelle 22 und 23 sind unsere R_F-Werte in den beiden Lösungsmitteln zusammengestellt.

b) Zweidimensionale Chromatographie der Testsubstanzen

Auf das gewaschene Papier wird je 4 cm vom unteren und seitlichen Rand entfernt eine Linie gezogen. Auf den Schnittpunkt der Linien trägt man je 0,01 ml der zu trennenden Substanzen auf und trocknet mit kaltem Föhn nach jedem Auftragen, so daß der Fleck einen Durchmesser von höchstens 1 cm hat. Das Papier wird zu einem Zylinder geformt und mit Klammern zusammengehalten. Man chromatographiert zuerst im sauren Lösungsmittel aufsteigend, Laufzeit über Nacht. Am anderen Morgen wird das Chromatogramm an der Luft getrocknet und,

Tabelle 22

Hf-Werte im sauren Lösungsmittel

Amorp. P.	ADP	AMP	G-1-P	G-6-P	FDP	2-PGs
0,55		0,12			0,10	0,31
0,46		0,15			0,09	0,34
0,42		0,14	0,13	0,10		
0,56						
0,57	0,11	0,16	0,34	0,11	0,09	
0,42	0,09		0,37	0,12	0,10	
0,45						
0,55	0,10	0,19	0,12	0,09		
0,40	0,09	0,18	0,19	0,08	0,14	0,32
0,51	0,12	0,14	0,15	0,15	0,11	0,30
0,50	0,08	0,21	0,15	0,14	0,14	0,35
0,49	0,09	0,18	0,16	0,17	0,12	0,36
0,59	0,10		0,24			0,43
0,52			0,24			0,41

Durchschnitt:

0,50 0,09 0,16 0,20 0,12 0,11 0,35

Tabelle 23

Rf-Werte im alkalischen Lösungsmittel

Anorg. P.	ATP	ADP	AMP	G-1-P	G-6-P	FDP	2-PGS	
0,36								
0,28								
0,35	0,40		0,44	0,44	0,39	0,30	0,39	
0,27	0,41		0,47	0,49	0,45	0,39	0,47	
0,26	0,32		0,40	0,44	0,49		0,34	
0,35	0,40			0,44	0,34		0,43	
0,29	0,31	0,22	0,37	0,43	0,37	0,30	0,38	
0,34	0,40	0,23	0,40	0,45	0,40	0,32	0,42	
0,35	0,39	0,28	0,43	0,40	0,36	0,30		
0,31	0,35	0,24	0,37	0,40			0,39	
0,34	0,39	0,25		0,41	0,31	0,30		
0,31		0,27	0,38	0,43		0,30		
0,31				0,45				
0,29	0,34			0,45		0,30		
0,34	0,41	0,22	0,41	0,45				
Durchschnitt:	0,31	0,36	0,25	0,40	0,44	0,38	0,31	0,40

um 90 Grad gedreht, in das alkalische Lösungsmittel gebracht. Dort bleibt es etwa 7 Stunden. Da die Verhältnisse der Rf-Werte untereinander bekannt sind, kann man das Lösungsmittel bis zum Rand durchlaufen lassen. Es wird entwickelt wie oben beschrieben.

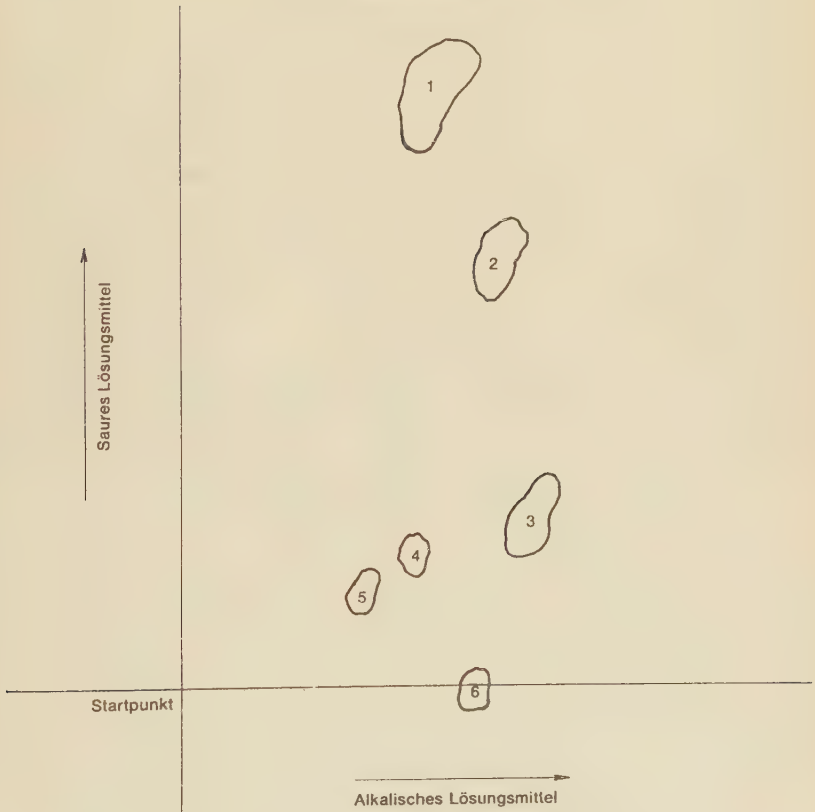
c) Zweidimensionale Chromatographie des säurelöslichen Phosphats von Rattenhaut und Rattenleber

Das Gewebe wird wie unter 3. mit 5 %-iger Trichlor-essigsäure extrahiert und der Extrakt auf 10 ml aufgefüllt. Jede Erwärmung muß sorgfältig vermieden werden, da die labilen Phosphatester sehr leicht zerfallen. Man trägt bei einer Ausgangsmenge von 3 g Haut bzw. 5 g Leber 0,1 bzw. 0,05 ml Extrakt in Portionen von jeweils 0,01 ml auf den Startpunkt auf. Nach jedem Auftragen wird mit kaltem Föhn getrocknet. Es wird zweidimensional aufsteigend chromatographiert, über Nacht in Isopropyläther - Ameisensäure, am anderen Tag 7 Stunden in Propanol - Ammoniak. Entwickelt wird wie oben beschrieben.

Bei der Haut war der chromatographische Nachweis der Phosphate wegen der geringen Konzentration der Substanzen im Extrakt schwieriger als bei der Leber. Ein stärkeres Einengen des Extraktes bringt jedoch keinen Vorteil, da die hohe Salzkonzentration die chromatographische Auftrennung stört (s. Abb. 2 und 3).

Abbildung 2

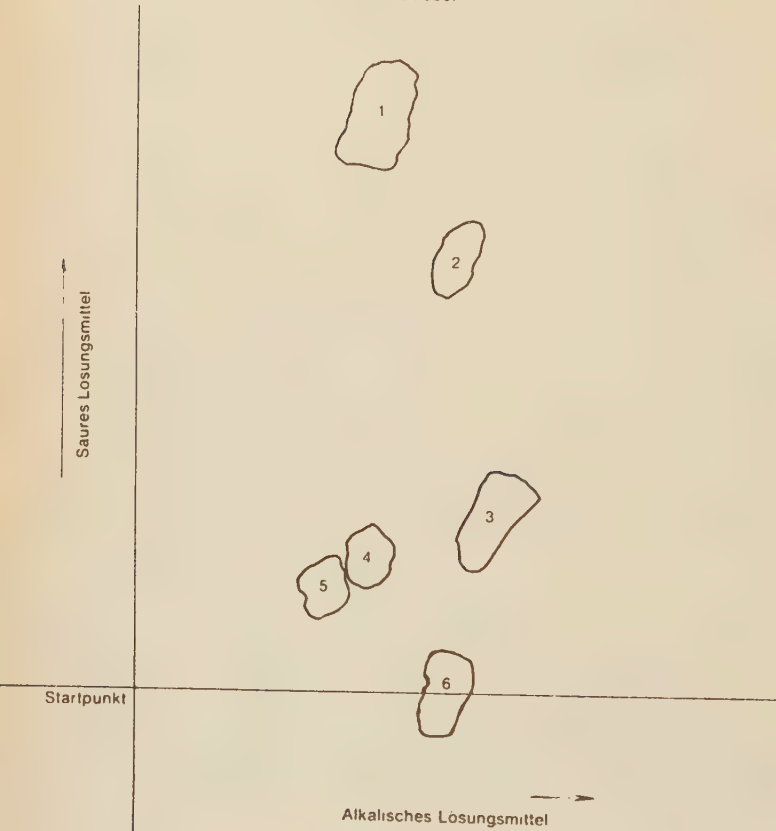
Chromatogramm des säurelöslichen Phosphats
der Rattenhaut



- 1 - anorgan. Phosphat
- 2 - Phosphoglycerinsäure (Konnte enzymatisch nicht nachgewiesen werden).
- 3 - AMP und G-6-P
- 4 - FDP
- 5 - ADP
- 6 - ATP

Abbildung 3

Chromatogramm des säurelöslichen Phosphats
der Rattenleber



- 1 anorgan. Phosphat
- 2 Phosphoglycerinsäure (Konnte enzymatisch nicht nachgewiesen werden)
- 3 AMP und G-6-P
- 4 FDP
- 5 ADP
- 6 ATP

Als Testsubstanzen zur Chromatographie wurden verwendet:

1. Adenosintriphosphat, Dinatriumsalz, soluble, Molekulargewicht 551
Serva, Entwicklungslabor, Heidelberg
2. Adenosin - Diphosphat + 4 H₂O, soluble
Molekulargewicht 592
Sigma, Chemical Company
3. Adenosine - 5 - Phosphoric Acid + 1 H₂O
Molekulargewicht 463
Sigma, Chemical Company
Wegen saurer Reaktion schlecht löslich, wird mit 1 n-NaOH neutralisiert.
4. d (+) Fructose - 1,6 - Diphosphorsäure, soluble, Ba-Salz
Molekulargewicht 476
C. F. Boehringer & Söhne, GmbH, Mannheim
5. d (+) Glucose - 1 - Phosphorsäure + 2 H₂O, Di-Ka-Salz, soluble
Molekulargewicht 261
C. F. Boehringer & Söhne, GmbH, Mannheim
6. d (+) Glucose - 6 - Phosphorsäure + 7 H₂O, Ba-Salz, unlöslich
Molekulargewicht 261
C. F. Boehringer & Söhne, GmbH, Mannheim
Das Barium wird mit einem Tropfen 1 n-H₂SO₄ gefällt, das Ganze zentrifugiert und der Überstand mit 1 n-NaOH neutralisiert.
7. d (+) 2-Phosphorglycerinsäure, Ba-Salz, unlöslich
Molekulargewicht 186
C. F. Boehringer & Söhne, GmbH, Mannheim
Das Barium wird mit H₂SO₄ gefällt, der Überstand mit NaOH neutralisiert.
8. Phosphatpuffer

5. Enzymatische Bestimmung der Verbindungen des säurelöslichen Phosphats

Zur enzymatischen Bestimmung wurde Perchlorsäureextrakt verwandt, da sich zeigte, daß Trichloressigsäure die Bestimmung von ATP stark hemmt. Perchlorsäure zeigte diesen Nachteil nicht, die Werte für das gesamtsäurelösliche Phosphat stimmten bei beiden Extrakten überein.

Man extrahiert etwa 5 g Haut bzw. Leber mit 0,5 n Perchlorsäure, wobei das Volumen des Extraktes höchstens 40 ml betragen soll. Dann wird mit 2 n KOH neutralisiert, das ausgefallene $KClO_4$ abfiltriert und das Filtrat gefriertrocknet. Der Rückstand wird mit 20 ml Aqua dest. aufgenommen.

Die Bestimmung der einzelnen Verbindungen erfolgte mit Hilfe enzymatischer Methoden, referiert bei MICHAL und LAMPRECHT (39), die darauf beruhen, daß man im gekoppelten optischen Test die Zu- bzw. Abnahme von DPNH (TPNH) mißt. Messung im Eppendorf-Photometer bei 366 Millimü.

1. Bestimmung von FDP

Die Bestimmung beruht auf der Spaltung von FDP durch Aldolase in zwei Triosephosphate, von denen das entstehende Dihydroxyacetonphosphat durch Glycerophosphatdehydrogenase und DPNH zu Glycerinphosphat hydriert wird. Temperatur: 25 ° C, Schichtdicke: 4 cm, Testvolumen: 4,15 cm³.

Testzusammensetzung: 3 bzw. 4 ml m/20 Tris-Puffer, p_H 7,4
1 bis 2 ml der zu untersuchenden Lösung
0,05 ml DPNH (50 mg/4 ml, 78,5 %-ig)
0,05 ml Glycerophosphatdehydrogenase
(1 mg/ml)
0,05 ml Aldolase (10 mg/ml)

Die Reaktion wird durch Aldolase ausgelöst.

2. Bestimmung von ADP und AMP

ADP wird durch Phosphoenolbrenztraubensäure und Pyruvatkinase in ATP umgewandelt.

Die entstehende Brenztraubensäure wird durch DPNH und Milchsäuredehydrogenase zu Milchsäure hydriert. Durch Zugabe von Myokinase, die aus ATP und AMP ADP bildet, kann man im gleichen Ansatz auch den Gehalt an AMP ermitteln. Temperatur: 25 ° C, Schichtdicke 1 cm, Testvolumen 2,44 bzw. 2,46 cm³.

Testzusammensetzung:

- 1,4 ml 1 m Triäthanolaminpuffer, p_H 7,5
- 0,5-1 ml der zu untersuchenden Lösung
- 0,1 ml Phosphoenolbrenztraubensäure
(50 mg Silberbariumsals/4 ml)
- 0,15 ml 2 m KCl
- 0,15 ml m/2 MgSO₄
- 0,1 ml DPNH (50 mg/4 ml, 78,5 %-ig)
- 0,02 Milchsäuredehydrogenase (5 mg/ml)
- 0,02 ml Pyruvatkinase (2 mg/ml)
- 0,02 ml Myokinase (5 mg/ml)

Die Extinktionsänderung ohne Myokinase zeigt den ADP-Gehalt an. Aus der Extinktionsänderung nach Zugabe der Myokinase errechnet sich der AMP-Gehalt.

3. Bestimmung von ATP und HMP

Beide Verbindungen können mit Hilfe von TPN und Glucose-6-Phosphatdehydrogenase bestimmt werden. HMP wird durch TPN und Glucose-6-Phosphatdehydrogenase dehydriert. Durch Zugabe von Glucose und Hexokinase, die aus Glucose und dem vorhandenen ATP Glucose-6-Phosphat bildet, kann auf dem gleichen Wege auch noch ATP bestimmt werden. Temperatur: 25 ° C, Schichtdicke 2 cm, Testvolumen 4,1 bzw. 6,1 cm³.

**Testzusammen-
setzung:**

2,5 - 3,5 ml m/20 Trispuffer, p_H 7,4
1 - 2 ml der zu untersuchenden Lösung
0,04 ml m/2 $MgSO_4$
0,1 ml TPN (3 mg/ml)
0,01 ml Glucose-6-phosphatdehydrogenase
(5 mg/ml)
0,4 ml m/2 Glucose
0,05 ml Hexokinase (10 mg/ml)

Zuerst wird die Extinktionsänderung ohne Glucose und Hexokinase gemessen, sie entspricht dem HMP-Gehalt. Die nach Zusatz von Glucose und Hexokinase eintretende Extinktion ergibt den ATP-Gehalt.

Sämtliche Substrate und Enzyme waren Präparate der Firma Boehringer & Söhne, Mannheim-Waldhof.

IV. Zusammenfassung

1. Es wurden in Rattenhaut und -leber der Gesamtphosphatgehalt sowie säurelösliches und anorganisches Phosphat bestimmt. Aus der Differenz zwischen säurelöslichem und anorganischem Phosphat wurde der Wert für das säurelösliche organische, aus der Differenz zwischen Gesamtphosphat und säurelöslichem Phosphat die Menge an säureunlöslichem Phosphat errechnet. Die gefundenen Werte wurden den entsprechenden Literaturangaben gegenübergestellt.

In der trockenen Rattenh a u t ergaben sich

für Gesamtphosphat	289,84 mg % P,
für gesamtsäurelösliches Phosphat	101,62 mg % P,
für anorganisches Phosphat	19,1 mg % P,
für säurelösliches organisches Phosphat	82,52 mg % P und
für säureunlösliches Phosphat	188,22 mg % P.

In der Rattenle b e r wurden gefunden:

Gesamtphosphat	1150,15 mg % P,
gesamtsäurelösliches Phosphat	343,43 mg % P,
anorganisches Phosphat	71,61 mg % P,
säurelösliches organisches Phosphat	271,82 mg % P und
säureunlösliches Phosphat	806,72 mg % P

des Trockengewichtes.

Die Gegenüberstellung der absoluten Zahlen für Haut und Leber zeigt, daß die Leber etwa das Drei - Vierfache an Phosphat enthält. Vergleicht man jedoch den Anteil der einzelnen Phosphatfraktionen am Gesamtphosphat, so ergibt sich eine weitgehende Übereinstimmung der Werte in Haut und Leber.

Setzt man das Ergebnis für Gesamtphosphat mit 100% an, so findet sich in der Haut ein Anteil des

säurelöslichen Phosphats von	35,06 %,
des anorganischen Phosphats von	6,5 %,
des säurelöslichen organischen Phosphats von	29,2 % und
des säureunlöslichen Phosphats von	64,94 %.

In der Leber beträgt der Anteil des	
gesamtsäurelöslichen Phosphats	29,86 %, der des
anorganischen Phosphats	6,13 %, der des
säurelöslichen organischen Phosphats	23,73 % und der
des säureunlöslichen Phosphats	70,14 %.

2. Mit Hilfe der Papierechromatographie konnte das säurelösliche Phosphat von Rattenhaut und -leber weiter aufgetrennt werden. Es wurden in beiden Geweben ATP, ADP, AMP, FDP, PGS und anorganisches Phosphat gefunden.

3. Im säurelöslichen Phosphat von Haut und Leber wurden die Verbindungen anschließend mit enzymatischen Methoden quantitativ bestimmt. Außer den papierchromatographisch identifizierten Verbindungen konnte noch G-6-P nachgewiesen werden, während der chromatographisch als PGS identifizierte Fleck sich enzymatisch nicht als solche bestätigen ließ. Es muß sich hierbei um eine Verbindung mit ähnlichem Rf-Wert handeln, die wir enzymatisch jedoch nicht näher bestimmen konnten. Für die Haut ergaben sich, bezogen auf Trockengewicht:

0,58 mg % ATP, 0,78 mg % ADP, 0,48 mg % AMP, 0,33 mg % G-6-P, 1,6 mg % FDP.

In der Leber fanden wir: 14,6 mg % ATP, 19,9 mg % ADP, 16,9 mg % AMP, 6,6 mg % G-6-P und 1,7 mg % FDP.

Es wurden die Werte für die einzelnen Verbindungen in Haut und Leber miteinander verglichen. Die Ergebnisse für Haut liegen ausnahmslos wesentlich niedriger. Da die Absolutwerte keinen näheren Einblick in die Abläufe geben, wurde das Verhältnis der Verbindungen zum gesamtsäurelöslichen Phosphat errechnet.

Dabei ergaben sich in der Haut für ATP 1,4 %, für ADP 2,3 %, für AMP 1,5 %, für G-6-P 0,99 % und für FDP 4,9 %.

In der Leber entfallen auf ATP 6,4 %, auf ADP 8,7 %, auf AMP 7,5 %, auf G-6-P 2,8 % und auf FDP 0,7 %.

Entsprechend den Absolutwerten sind auch die prozentualen Anteile der Nucleotide und von G-6-P in der Haut viel niedriger. Im Gegensatz dazu beträgt der Anteil von FDP das Siebenfache dessen der Leber. Es werden die möglichen Ursachen für diese Ergebnisse diskutiert.

V. Literaturverzeichnis

- (1) K. LANG : Der intermediäre Stoffwechsel; Springer Verlag; 1952
- (2) K. LANG; HOPPE- SEYLER-
THIERFELDER : Handbuch der physiologisch und patholo-
gisch-chemischen Analyse; Vol. III/1, 159
Springer-Verlag; 1955
- (3) C.C.A. SCHMIDT,
D.R. GREENBERG : Physiol. Rev. 15, 297; 1935
- (4) H. ARON : Handbuch Biochem. 7, 152; 1935
- (5) A. FLECKENSTEIN,
E. GERLACH : Arch. exp. Path u. Pharm. 219, 531; 1953
- (6) W.O. FENN : J. Biol. Ch. 128, 297; 1939
- (7) R. SALGUES : Bull. Soc. Chim. biol. 20, 1223; 1938
- (8) S.E. KERR, L. DAUD : J. biol. Ch. 109, 301; 1935
- (9) M. RONDEWALD, M. WEBER : Hoppe-Seyler's Ztschr. 317, 217; 1959
- (10) E.M.Mc. KAY, H.C. BERGMAN : J. biol. Ch. 105, 59; 1934
- (11) K. LOHMANN, L. JENDRASSIK : Biochem. Z. 178, 419; 1926
- (12) C.H. FISKE, Y. SUBARROW : J. biol. Ch. 66, 375; 1925
- (13) F. SCHEEL : Ztschr. f. analyt. Chem. 105, 256; 1936
- (14) S. RAPOPORT, F. LEVA,
G.M. GUEST : J. biol. Ch. 149, 57; 1943
- (15) J. SACKS : J. biol. Ch. 181, 655; 1949
- (16) W.C. SCHNEIDER, V.R. POTTER : J. biol. Ch. 177, 893; 1949
- (17) F. MUNTWYLER, S. SEIFTER,
D.M. HARKNESS : J. biol. Ch. 184, 181; 1950
- (18) M.A. SWANSOM, C. ARTOM : J. biol. Ch. 187, 281; 1950
- (19) T. THEORELL : Biochem. Z. 230, 1; 1931

- (20) R.G. BANDURSKI, B. AXELROD: J. biol. Ch. 193, 405; 1951
- (21) L.V. EGGLESTON, R. HEMS : Biochem. J. 52, 156; 1952
- (22) R.J. LUDFORD : Quart. J. Micr. Sci. 69, 27; 1924
- (23) D.J. KOOYMAN : Arch. of Dermatol. and Syphil. 25, 444; 1932
- (24) M. RONDEWALD, M. WEBER : Hoppe-Seyler's Ztschr. 306, 90; 1957
- (25) O. HELVE : Acta med. scand. 125, 505; 1946
- (26) H.D. CREMER, J. FÜHR : Hoppe-Seyler-Thierfelder:
Handbuch der physiologisch und
pathologisch-chemischen Analyse,
Vol. V, 477; 1955
- (27) A. NADEL : Arch. of Dermatol. and Syphil. 165, 507; 1932
- (28) E. GERLACH, A. FLECKEN-
STEIN, E. GROSS : Pflüger's Archiv 266, 528; 1958
- (29) L. MACHO : Nature 180, 1351; 1957
- (30) S.A. BROOKS, J.C. LAWRENCE,
C.R. RICKETTS : Biochem. J. 73, 566; 1959
- (31) E.S. ROREM : Nature 183, 1739; 1959
- (32) H. ROSENBERG : J. Chromatogr. 2, 487; 1959
- (33) M. WEBER, M. WIRTHS,
M. RONDEWALD : Hoppe-Seyler's Ztschr. 324, 219; 1961
- (34) M. RONDEWALD, H. GLAS-
macher : Hoppe-Seyler's Ztschr. 321, 133; 1960
- (35) T.A.J. PRANKERD,
K.J. ALTMANN : Nature 173, 870; 1954
- (36) J. GREENWALD : J. biol. Ch. 63, 339; 1925
- (37) C.S. HANES, F.H. ISHER-
WOOD : Nature 164, 1107; 1949

- (38) R. KIMMELSTIEL - FREINKEL : J. Invest. Dermat. 34, 37; 1960
- (39) G. MICHAL, W. LAMPRECHT : Hoppe-Seyler's Ztschr. 324, 170; 1961
- (40) J.R.G. BRADFIELD : Nature 167, 40; 1951
- (41) W.S. BULLOUGH : Nature 163, 680; 1949
- (42) V.C. RONECKLES, G. KROTKOV : Arch. Biochem. 80, 94; 1959
- (43) G. WIDMARK, B. VAHLQUIST : Biochem. Z. 230, 245; 1931
- (44) H. A. KREBS : Atmung und Gärung von lebenden Zellen in:
C. OPPENHEIMER u. L. PINCUSSEN:
Tabulae biol. period. Vol. III,
209; 1934 (Thieme, Leipzig)
- (45) PH.D. ADAMS : J. biol. Ch. 116, 641; 1936
- (46) A.K. PRESNELL : J. biol. Ch. 121, 5; 1937
- (47) E.S. COOK et al. : Stud. Inst. Divi. Thomae 1, 23; 1938
- (48) E.S.G. BARRON : J. Invest. Dermat. 11, 97; 1948
- (49) H.E. PAUL : Arch. Biochem. 17, 429; 1948
- (50) R.D. GRIESEMER : J. Invest. Dermat. 22, 299; 1954
- (51) A. BAHMANN : Biochem. Z. 287, 145; 1936
- (52) Y.M. GOUDARZI : Dissertation Frankfurt/Main 1963;
unveröffentlicht
- (53) K. FELIX : Arch. f. Dermat u. Sphil. 184,
141; 1943
- (54) R. BLOOM, H. STETTER : J. biol. Ch. 212, 555; 1955
- (55) H.G. ALBAUM, R. LIPSHITZ : Arch. Biochem. 27, 102; 1950
- (56) R. DERACHE, J. TREMOLIERES,
G. GRIFFATON, R. LOWY : Bull. Soc. Chim biol. 38, 717;
1956 Paris
- (57) H. SCHRIEFERS : Die medizin. Welt, Nr. 1; 1961
- (58) F. LEUTHARDT : Physiol. Chemie, Walter de Gruyter
& Co., Berlin 1957

- (59) P. KARLSON : Biochemie, Thieme-Verlag, Stuttgart; 1961
- (60) G.A. LE PAGE : Cancer Res. 8, 193; 1948
- (61) H.G. ALBAUM, H.F. DRURY,
T. CAYLE : Arch. Biochem. 41, 274; 1952
- (62) J. SACKS : Arch. Biochem. 30, 423; 1951
- (63) P.R. VENKATARAMAN,
M.P. SCHULMANN,
D.M. GREENBERG : J. biol. Ch. 185, 175; 1950
- (64) H.W. SPIER, G. PASCHER : Arch. f. klin. und exp. Dermat.
201, 181; 1955
- (65) T. WOOD : J. Chromatogr. (AMST.) 6, 142; 1961
- (66) J. TABACHNIK : J. Invest. Dermat. 32, 563; 1959
- (67) G.C. MATHISON : Biochem. J. 4, 233; 1909

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer:

Prof. Dr. R. Altmann	Innere Medizin
Prof. Dr. W. Amelung	Innere Medizin
Prof. Dr. W. Artelt	Geschichte der Medizin
Prof. Dr. H. Betke	Arbeits- u. Sozialhygiene
Prof. Dr. Boenninghaus	HNO - Heilkunde
Prof. Dr. M. Czerny	Physik
Prof. Dr. K. Felix	Physiologische Chemie
Prof. Dr. H. Frick	Anatomie
Prof. Dr. R. Geibendörfer	Chirurgie
Prof. Dr. H. Giersberg	Zoologie
Prof. Dr. K. Greven	Physiologie
Prof. Dr. E. Güntz	Orthopädie
Prof. Dr. W. Halbsguth	Botanik
Prof. Dr. R. Heinecker	Innere Medizin
Prof. Dr. L. Heller	Geburtshilfe u. Frauenheilkunde
Prof. Dr. K. Herzberg	Hygiene und Bakteriologie
Prof. Dr. F. Hoff	Innere Medizin
Prof. Dr. P. Holtz	Pharmakologie u. Toxikologie
Prof. Dr. Jantz	Psychiatrie und Neurologie
Prof. Dr. J. Jürgens	Innere Medizin
Prof. Dr. G. Kahlau	Pathologie
Prof. Dr. P. Kramp	Anthropologie
Prof. Dr. H. Kühne	Chirurgie
Prof. Dr. E. Landes	Dermatologie
Prof. Dr. G. Leonhardi	Dermatologie
Prof. Dr. H. Lewin	Geburtshilfe u. Frauenheilkunde
Prof. Dr. W. A. Lieb	Augenheilkunde
Prof. Dr. H. Martin	Innere Medizin
Prof. Dr. R. Mittermaier	HNO - Heilkunde
Prof. Dr. R. Ortmann	Anatomie
Prof. Dr. K. L. Radenbach	Innere Medizin

Prof. Dr. B. Rajewsky
Prof. Dr. J. v. Reckow
Prof. Dr. P. Royen
Prof. Dr. de Budder
Prof. Dr. Sandritter
Priv. Doz. Dr. O. Schmith
Prof. Dr. Schümann
Prof. Dr. D. Starck
Prof. Dr. A. W. Schwenzer
Prof. Dr. H. Thiel
Prof. Dr. E. Ungeheuer
Prof. Dr. K. Wezler
Prof. Dr. K. Weiße
Prof. Dr. Th. Wieland
Prof. Dr. Wiethold

Prof. Dr. R. K. Zahn
Prof. Dr. J. Zutt

Med. Strahlenkunde
Zahn-, Mund- u. Kieferheilkunde
Anorganische Chemie
Kinderheilkunde
Pathologie
Sozialhygiene
Pharmakologie
Anatomie
Geburtshilfe u. Frauenheilkunde
Augenheilkunde
Chirurgie
Physiologie
Kinderheilkunde
Organische Chemie
Ärztliche Rechts- u. Berufskunde
Versicherungsmedizin
Gerichtsmedizin
Physiologie
Psychiatrie und Neurologie

Lebenslauf

Am 9. September 1935 wurde ich als erstes Kind der Eheleute Othmar und Elisabeth Rauen, geb. Schaub, in Wiesbaden geboren. Von 1942 bis 1946 besuchte ich die Volksschule in Wiesbaden, anschließend das Realgymnasium für Mädchen am Boseplatz, wo ich 1956 die Reifeprüfung ablegte. Im Sommersemester 1956 begann ich mein Medizinstudium an der Universität Frankfurt am Main. 1958 bestand ich dort die ärztliche Vorprüfung, 1962 das medizinische Staatsexamen. Meine Medizinalassistentenzeit absolvierte ich an verschiedenen Krankenanstalten in Wiesbaden. Seit März 1965 arbeite ich in der Universitätskinderklinik Mainz.

Wiesbaden, den 28. Sept. 1965

Sigrid Rauen

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt/Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

"Phosphatverbindungen in Haut und Leber der Ratte" im Labor der Universitäts dermatoklinik Frankfurt/Main, unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. G. Leonhardi, mit Unterstützung durch Frau Dr. rer. nat. L. Löhner, ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Wiesbaden, den 28. Sept. 1965

Sigrid Rauen

Danksagung

Herrn Professor L e o n h a r d i möchte ich zum Schluß herzlich für die Überlassung des Themas und zahlreiche Anregungen bei der Arbeit danken.

Zu besonderem Dank fühle ich mich Frau Dr. L ö h n e r verpflichtet, die mir jederzeit unermüdlich und bereitwillig mit Rat und Hilfe zur Seite stand.

Wiesbaden, den 28. Sept. 1965

Sigrid Rauen

